

Title	Neuroaxonal Dystrophy in Calcium-Independent Phospholipase A2 $\beta$ Deficiency Results from Insufficient Remodeling and Degeneration of Mitochondrial and Presynaptic Membranes
Author(s)	別宮, 豪一
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59001">https://hdl.handle.net/11094/59001</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	別宮 豪一
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 25112 号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Neuroaxonal Dystrophy in Calcium-Independent Phospholipase A <sub>2</sub> β Deficiency Results from Insufficient Remodeling and Degeneration of Mitochondrial and Presynaptic Membranes (カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> β 欠損マウスでは、ミトコンドリアと軸索終末の膜再構築不全によって神経軸索ジストロフィを生じる。)
論文審査委員	(主査) 教授 望月 秀樹 (副査) 教授 武田 雅俊 教授 青笹 克之

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

Infantile Neuroaxonal Dystrophy (INAD)とは、中枢・末梢神経の広範にわたり、軸索腫大(spheroid)およびtubulovesicular structureを認める神経変性疾患である。近年、膜リン脂質の再構築に重要であるカルシウム非依存性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>β (iPLA<sub>2</sub>β)の遺伝子異常がINADの原因となることが報告された。以前、iPLA<sub>2</sub>β欠損(KO)マウスが進行性の運動障害をきたし、かつINADに類似する神経病理学的所見を呈することを報告した。さらに、病初期には正常に見える細胞体内や軸索内に、進行期ではspheroid内に特徴的なperiodic acid-Schiff (PAS)陽性顆粒が見られた。今回は、iPLA<sub>2</sub>β KOマウスにおける軸索変性のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 〔 方法ならびに成績 〕

iPLA<sub>2</sub>β KOマウス(15週齢;発症前、n=2、55週齢;発症早期、n=4、100週齢;終末期、n=5)の脊髄および坐骨神経につき、ミトコンドリア内膜のマーカーであるCCO、外膜のマーカーであるTOM20、cytochrome c、脂質が酸化を受けて生成される二次生成物である4-HNEに対する一次抗体を用い免疫組織染色を行った。また、各マウスの脊髄および坐骨神経につきエボンブロックを作成し、semi-thin sectionに対しPASとチオニンの二重染色を行った。脊髄後角において、PAS陽性顆粒、spheroid、空胞の数をカウント、また坐骨神経において、PAS陽性顆粒、ミエリンオポイド、大径有髄線維の数をカウントし、各週齢のKOマウス間で比較した。また、iPLA<sub>2</sub>β KOマウスの脊髄を超微形態的に解析し、光顕所見との比較を行った。

iPLA<sub>2</sub>β KOマウス(15週齢)では、前角細胞や後根神経節細胞の細胞体内に多数のPAS陽性顆粒を認めた。PAS陽性顆粒はTOM20に強陽性であったが、CCOには陰性であった。近位軸索内においても多数のPAS陽性顆粒が見られたが、病期の進行につれ大型かつ不整形となった。脊髄後角において、15週齢では少数のPAS陽性顆粒とspheroidを認めるのみであったが、経過と

もに有意に増加した。坐骨神経では、病期の進行とともに大径線維が減少し、PAS陽性顆粒およびオボイドが増加した。なお、近位軸索内にはcytochrome *c*の充満した顆粒を多数認めた。iPLA<sub>2</sub>β KOマウスでは白質を中心に4-HNEの高発現が見られ、経過とともに顕著となった。

電顕上、PAS陽性顆粒は内膜が変性しdense granuleに置換されたミトコンドリアであることが判明した。56週齢からは、tubular and branching cristaeを有する変性ミトコンドリアを認めるようになった。軸索内において二重膜の破壊した変性ミトコンドリアを認め、その近傍では細胞骨格成分が消失していた。56週齢以降、dense granuleを有する異常ミトコンドリアが軸索内で集塊をなしspheroidを形成、またtubular and branching cristaeを有する異常ミトコンドリアが軸索内でtubulovesicular structureを形成した。

次に、100週齢のiPLA<sub>2</sub>β KOマウスの脊髄における膜リン脂質の分布を質量分析顕微鏡およびタンデムマススペクトロメトリにて解析し、野生型マウス(WT)と比較を行った。

iPLA<sub>2</sub>β KOマウスではWTマウスと比較して、脊髄灰白質全体において後角を中心に、ドコサヘキサエン酸(DHA)含有フォスファチジルコリン(PC)およびアラキドン酸含有PCの著明な増加を認めた。一方で、ミエリンの構成脂質であるオレイン酸含有PCは低下を認めた。またKOマウスではWTマウスと比較して、フォスファチジルエタノラミンおよびカルジオリビンの増加を認めた。15週齢の脊髄後角において、光顕では少数のPAS陽性顆粒のみを認めたが、超微形態的には軸索末端の異常拡張や消失、変性膜様構造物を認めた。軸索末端内には正常ミトコンドリア像を認めた。100週齢になると、軸索末端にtubulovesicular structureの形成を認め、その内部に異常ミトコンドリア、膜様変性構造物を認めた。光顕および電顕にて、タイプの異なるtubulovesicular structureが近接している所見を認めた。

#### [ 総 括 ]

INADの軸索変性のメカニズムとして、ミトコンドリア内膜および軸索末端のリン脂質再構築不全に伴う膜変性という2つの経路が考えられた。

①内膜の変性したミトコンドリアであるPAS陽性顆粒が細胞質から軸索へ順行性輸送され、軸索内においてミトコンドリア二重膜が破壊されるとROSやcytochrome *c*が放出され、局所にて軸索変性やspheroid形成が起こる。②シナプス前膜においては、特にDHA含有PCの増加により膜の異常伸長が起こり、やがてシナプス小胞や膜の消失、膜様変性物の蓄積が起こる。そしてシナプス終末にtubulovesicular structureが形成される。その近傍に、異常ミトコンドリアが近位軸索より輸送されtubulovesicular structureを形成する。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は、膜リン脂質の再構築に重要であるカルシウム非依存性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>βの遺伝子を欠損させたInfantile Neuroaxonal Dystrophy (INAD)の疾患モデルマウスを用い、脊髄の免疫組織学的染色及び組織染色を用いた光顕像を定量的かつ病理学的に評価し、電顕上での超微形態像と比較検討した。それによって、脊髄全体における異常ミトコンドリアの分布が定量的、経時的に評価された。また、ミトコンドリア内膜の変性と前シナプス膜の変性像がごく初期から認められ、双方がINADに疾患特異性の高い病理所見であるtubulovesicular structureを伴うことも明らかとした。さらに、質量分析顕微鏡を用いた解析結果と比較検討することにより、膜リン脂質の代謝不全から神経軸索の変性が生じることを示した。

本研究は、細胞膜リン脂質の代謝不全が、神経変性疾患の原因となることを病理学的に示した貴重な報告であり、学位の授与に値すると考えられる。